Estandarización de los métodos electroforéticos en geles de poliacrilamida en el Phast System y cromatográficos para la caracterización de nuevos antígenos vacunales y componentes de medios de cultivo

Ileana Martínez, María de los Ángeles Padrón, Rubén Cabrera, Michel Acosta, Yadira Pino, Yamisley González, Miguel E. Martínez, Gustavo Bracho, Yisabel Aranguren, Yovania Fernández, José Luis Pérez, Marta González, Sara Catalina Esnard, Bárbara Cedré, Luis García.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana. Cuba.
E-mail: imartinez@finlay.edu.cu

En este trabajo se realizó un análisis de diferentes parámetros que caracterizan la estandarización para la determinación del tamaño molecular de nuevos antígenos de interés vacunal, a través de electroforesis en "Phast System" y de distintas matrices cromatográficas. La evaluación electroforética de la linealidad en las curvas de patrones indicó valores de coeficientes de correlación y determinación superiores a 0,98, con una adecuada repetibilidad; no se manifestaron diferencias entre los resultados obtenidos por varios analistas, en días diferentes y el método resultó ser exacto y robusto en las condiciones recomendadas. Se evaluaron los parámetros que caracterizan la eficiencia en el empaquetamiento de cuatro matrices cromatográficas (Superosa 12, Sephacryl S-100, Sepharosa CL- 4B y Sephacryl S-1000). Los resultados obtenidos para ambos sistemas de determinación permitieron la evaluación satisfactoria de muestras de proteínas de membrana externa y lipopolisacárido, procedentes de *Vibrio cholerae*, *Leptospira ssp*, *Pseudomona aeruginosa* y *Shigella ssp*.

Palabras claves: Estandarización, electroforesis, cromatografía, *Vibrio cholerae*, *Leptospira ssp*, *Pseudomona aeruginosa*, *Shigella ssp*.

Introducción

La evaluación de métodos analíticos para la caracterización de moléculas componentes de nuevos productos biológicos desde la etapa de investigación, garantiza el desarrollo posterior de metodologías analíticas adecuadas que cumplan con las regulaciones para el control de la calidad de los mismos.

El proceso de estandarización de un método permite estudiar las condiciones de temperatura, pH, agitación, iluminación, humedad y otros requisitos prácticos que influyen en el resultado final. Este conjunto de estudios constituye la antesala de la validación que como proceso más complejo, establece que las características determinadas previamente, reúnen los requisitos para la aplicación de la técnica analítica. Este proceso requiere un entorno que garantice la seguridad de los resultados obtenidos en cuanto al entrenamiento y calificación del personal y las instalaciones, verificación de los instrumentos de medición, control de equipamiento y de la documentación, por último, la evaluación de los parámetros de validación del método (1, 2).

No existen referencias acerca de los criterios generales para la validación del método electroforético en geles de poliacrilamida ejecutado en un Phast System (Pharmacia, Suecia). Este sistema de alta precisión, rapidez y sensibilidad comparable con las técnicas radioisotópicas, puede separar moléculas a través de diferentes variantes de operaciones: electroforesis nativa y bidimensional, SDS-PAGE, focalización isoeléctrica, a la vez que permite la detección a través de diferentes formas programadas de tinción (3). El método de cromatografía de tamizaje molecular es también muy utilizado para la caracterización de antígenos vacunales. Su correcta aplicación depende de una serie de parámetros que permiten la verificación de la eficiencia del sistema. En el presente trabajo se propone la evaluación de cuatro matrices cromatográficas (Superosa 12, Sephacryl S-100,

Sephacryl S-1000 y Sepharosa CL-4B), en cuanto a: calidad del empaquetamiento (número de platos teóricos, altura del plato y asimetría), linealidad de las curvas y precisión del sistema (4). Se propone, además, el análisis electroforético de los parámetros: Linealidad de las curvas para determinación de tamaño molecular, Repetibilidad, Precisión intermedia, Exactitud y Robustez para su aplicación como control analítico del método con la variante de SDS-PAGE.

Ambos métodos pueden contribuir a la caracterización de proteínas de membrana externa y de lipopolisacárido purificados a partir de los microorganismos *Vibrio cholerae*, *Leptospira ssp.*, *Pseudomona aeruginosa*, *Shigella ssp*. Estos antígenos se evalúan como vacunales en fase de investigación dentro de la VPI del Instituto Finlay.

Materiales y métodos

Materiales de referencia

Se evaluó el parámetro de linealidad utilizando los patrones de pesos moleculares para SDS-PAGE: Fosforilasa b (94 kDa), Albúmina (67kDa), Ovoalbúmina (43kDa), Anhidrasa carbónica (30 kDa), Inhibidor de tripsina (20.1 kDa), α-Lactalbúmina (14.4 kDa), todos de la firma Pharmacia (Suecia). Se utilizaron, además, patrones de pesos moleculares cromatográficos: Tiroglobulina (669 kDa), Apoferritina (443 kDa), β- Amilasa (200 kDa), Alcohol deshidrogenasa (150 kDa), Albúmina (66 kDa), Ovoalbúmina (43 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Citocromo C (12.4 kDa) procedentes de la firma Sigma (EU), excepto Quimotripsinógeno (25 kDa) procedente de Pharmacia (Suecia).

Muestras

Se utilizó una solución de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma, EU) 1mg/mL (66 kDa) para la estandarización del método electroforético. Se evaluaron proteínas de membrana externa purificadas a partir de *V. cholerae*, *Leptospira ssp*, *P. aeruginosa* y *Shigella ssp* (1 – 2 mg/mL) según lo recomendado por Campa y col. (5), de lipopolisacárido purificado de *P. aeruginosa* (2 mg/mL por peso seco) a través del procedimiento diseñado por Westphal y Jam (6) y cuatro lotes de BSA (Sigma, EU) 1 mg/mL utilizada como ingrediente a medios de cultivo.

Métodos

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras. Se utilizó un sistema homogéneo discontinuo de geles (concentrador 6%, separador 12,5%), con una solución reguladora del gel de acetato 0.112 mol. L^{-1} Tris 0.112 mol . L^{-1} pH 6.5 y una solución reguladora de corrida Tricina 0.2 mol. L^{-1} Tris 0.2 mol . L^{-1} SDS 0,55% pH 8.1. El equipo se programó para condiciones de corridas de 250 V, 1.0 mA, 3.0 W a 15 °C, según se describe en el Manual del Usuario (7). Se aplicaron 4 μL de muestras tratadas previamente con una solución de Tris-HCl 0.1 mol . L^{-1} pH 6.8, β-mercaptoetanol 1%, SDS 2%, glicerol 0,1%, bromofenol azul 0,1%, en una relación 1:1 y calentadas a 100 °C, durante 5 min.

Para la tinción de las bandas se utilizaron dos variantes: una con una solución colorante de azul Coomassie 0,1%, metanol 40% y ácido acético 10%, durante 1 h y se destiñeron con una solución decoloradora (metanol 40%, ácido acético 10%); la segunda, con un sistema de revelado con plata, en el que se lavó previamente el gel con etanol 50% ácido acético 10%, durante 2 min a 50 °C. Se incubó con formaldehído 8,3%, durante 6 min a 50 °C. Se lavó dos veces con agua, durante 2 min a 50 °C y se incubó con nitrato de plata 0,25%, durante 13 min a 40 °C. Posteriormente se lavó dos veces con agua durante 30 s a 30 °C y se desarrolló el color con una solución de carbonato de sodio 2,5% y 40 μL de formaldehído. Finalmente se lavó con agua destilada y se detuvo la reacción con una solución de ácido acético 5%, durante 2 min a 50 °C (7).

Se determinó el tamaño molecular (PM) de las muestras a través de un programa computarizado acoplado a un densitómetro ImageMaster USD con un software 1DImageMaster (Pharmacia Biotech, Suecia), tomando como referencia las proteínas de tamaños moleculares conocidos.

Para la estandarización se utilizó una solución de BSA 1 mg/mL y se determinaron los parámetros: Linealidad (análisis de la regresión en términos de coeficiente de correlación r y de determinación r^2), Repetibilidad (coeficiente de variación entre los valores de PM de las réplicas), Precisión intermedia (coeficientes de variación y pruebas F y t entre los valores de PM obtenidos por dos

analistas, en tres días), Exactitud (coeficientes de variación entre los PM determinados y los valores referidos para la BSA), Robustez (coeficientes de variación entre los PM obtenidos cuando el revelado se realizó a 18 y 50 °C) (7).

Se evaluaron proteínas de membrana externa purificadas a partir de *V. cholerae*, *Leptospira ssp.*, *P. aeruginosa* y *Shigella* y diferentes lotes de BSA utilizados en la preparación de medios de cultivo.

Cromatografía en gel. Se realizaron corridas cromatográficas en los cuatro geles seleccionados y en un sistema FPLC (Pharmacia - LKB, Suecia). Se utilizaron dos soluciones reguladoras de pH: Tris-HCl- EDTA- Desoxicolato de sodio pH 8,5 (para la equilibración de las matrices Superosa 12, Sephacryl S-100 y Sephacryl S-1000) y NaCl 0.15 mol . L^{-1} (para la Sepharosa CL–4B). Se aplicaron muestras de 100–1000 μL con velocidades de flujo de 0.3–0.4 mL/min y se registraron absorbancias a 280 nm en un detector SII (Pharmacia-LKB, Suecia) y la variación del índice de refracción en un refractómetro K-2300 (Knauer, Alemania), respectivamente. Se determinó el volumen total (Vt) en el que eluye el máximo de absorbancia de la acetona 1% y el volumen de elusión (Ve) en el que eluye el máximo de absorbancia de las muestras aplicadas disueltas en una u otra solución (4). Se evaluó el valor de la constante de distribución (Kav) y las curvas patrones Kav vs Log PM para cada tipo de matriz (4). La calidad del empaquetamiento de la columna se determinó a través del número de platos teóricos (N), altura de platos teóricos (HETP) y asimetría (Af) del pico (4). La evaluación se realizó a partir del tamizaje molecular de la acetona 1% y de lo recomendado para la determinación de estos parámetros (4). Se determinó la precisión del sistema a través del coeficiente de variación entre los valores del parámetro, obtenidos en diferentes días, para la misma muestra (8).

Resultados y discusión

Electroforesis en geles de poliacrilamida. En el presente trabajo se describe la estandarización de la determinación del tamaño molecular de biomoléculas en el "Phast System", como un sistema rápido, sensible y preciso para la caracterización de antígenos de interés vacunal.

Los requisitos para el desarrollo de este proceso no se encuentran descritos en trabajos anteriores por lo que se tuvo en cuenta que la técnica debía clasificarse dentro de la categoría A de métodos analíticos, relacionados con la evaluación de la identidad de sustancias a granel o principios activos (9). De tal manera que los parámetros seleccionados para el análisis, respondieron a esta clasificación. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de los parámetros de estandarización para la determinación del tamaño molecular de las proteínas por SDS-PAGE en el sistema Phast System

Parámetros de estandarización	Método de tinción con azul Coomassie	Método de tinción con plata	Referencias (Ferreiro y col.,1999), PV-11-028
Repetibilidad CV (%)	2 – 4	1 – 5	< 3
Precisión intermedia Días CV (%) Analistas CV (%)	5 4 (No hay diferencias) Fcal = 0,633 Ftab = 4,196 tcal = 0,796 ttab = 2,048	6 5 (No hay diferencias) Fcal = 1,729 Ftab = 4,196 tcal = 1,315 ttab = 2,048	< 5 < 5 Sin diferencias
Robustez CV (%) (18 Y 50 °C)	2 (No hay diferencias) Fcal = $3,87x10^{-5}$ Ftab = 5,318 tcal = 0,0062 ttab = 2,306	---------	Sensibilidad a variaciones en el tratamiento de las muestras
Exactitud CV (%)	< 3	< 4	Sin referencias

Linealidad			
- Intervalos de pendiente	**-0,01567 a - 0,006603**	**-0,01188 a - 0,006475**	**-0,5 a –0,34**
- Intervalo de intercepto			
Coeficiente R^2	**11,58 A 12,04**	**-11,85 A 11,99**	**4,03 a 5,73**
	> 0,99	**> 0,98**	

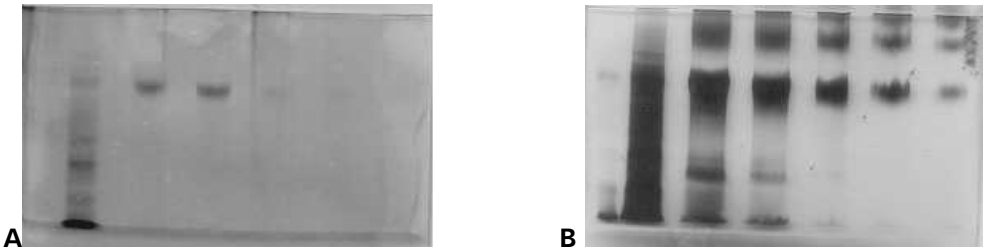
Número total de aplicaciones analizadas n = 108
Fcal: Parámetro F calculado en un análisis de varianza
Ftab: Parámetro F obtenido a partir de una tabla para un determinado tamaño de muestra (n) y $\alpha = 0,05$
tcal: Parámetro t calculado en un análisis de medias
ttab: Parámetro t obtenido a partir de una tabla para un determinado tamaño de muestra (n) y $\alpha = 0,05$

Se analizó la linealidad a través de los parámetros que caracterizan la regresión lineal (los intervalos de confianza de la pendiente y el intercepto y los valores de los coeficientes de correlación y determinación). En todos los casos (Tabla 1) resultaron en el orden de los obtenidos durante la validación de la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras, como prueba de identidad de la materia prima y del producto final de la vacuna VA-MENGOC BC®, resumidos en el Informe Técnico del Protocolo de Validación PV-11-028 (10), del Instituto Finlay.

Se seleccionó BSA para el análisis general del resto de los parámetros, teniendo en cuenta que es una proteína ampliamente utilizada para el desarrollo de otros métodos analíticos y electroforéticos, lo que permitirá una referencia más general si posteriormente se deseara analizar otros tipos de antígenos.

En las Figuras 1 A y B se muestra la presencia de las bandas de albúmina con tamaños moleculares en un intervalo de confianza de 66 $\pm$ 1 kDa, que se hizo más evidente cuando se realizó el revelado con plata (en el rango de 0,25 – 2 μg), lo que demostró una mayor sensibilidad en dicho revelado con relación a la tinción con azul Coomassie. Los valores de los coeficientes de variación (CV) entre los tamaños moleculares de las réplicas pueden considerarse satisfactorios, aún cuando se recomiendan valores menores del 3% para métodos colorimétricos (1, 8). El método es preciso por cuanto no se presentaron diferencias significativas entre analistas y días y puede considerarse que la exactitud es adecuada en las condiciones analizadas, en términos de los CV calculados entre los tamaños moleculares determinados y los referidos para la BSA (Tabla 1). Como dato adicional, en la Figura 2 se muestra el análisis de las correlaciones entre los tamaños moleculares determinados para las diferentes proteínas patrones (cuando se utilizó como referencia un estándar de Sigma, EU) y los tamaños moleculares que refiere el productor de las mismas (Pharmacia, Suecia). Los resultados indicaron coeficientes de determinación superiores a 0,99, lo que avala una satisfactoria exactitud.

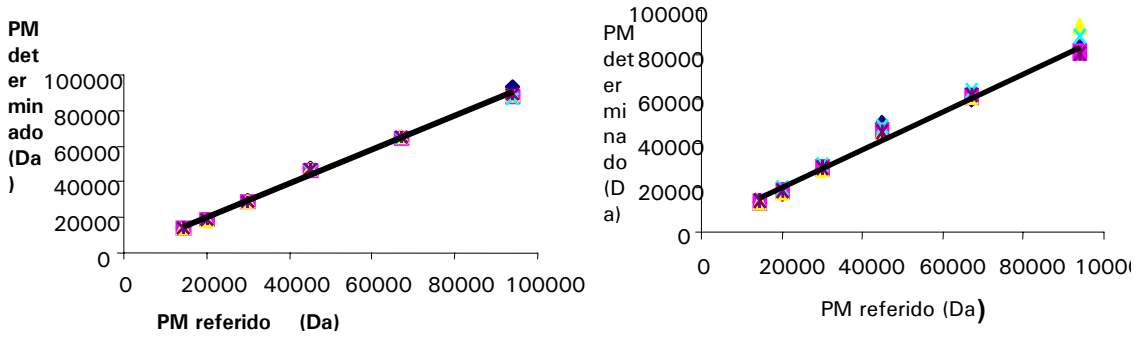
Figura 1. Determinación del rango de concentraciones de proteína para la evaluación del tamaño molecular por SDS-PAGE en el "Phast System"



A. Tinción con Azul Coomassie **B. Tinción con Plata**

1) Patrón PM, BSA (Sigma) en 4μL: 2) 2 μg, 3) 1 μg, 4) 0,5 μg, 5) 0,25 μg, 6) 0,125 μg

Figura 2. Análisis de la exactitud en la determinación de proteínas patrones de referencia (Pharmacia, Suecia)



A **B**

Patrones de PM: Fosforilasa b (94 kDa), Albúmina (67 kDa), Ovoalbúmina (43 kDa), Anhidrasa carbónica (30 kDa), Inhibidor de tripsina (20,1 kDa), a -Lactalbúmina (14,4 kDa)

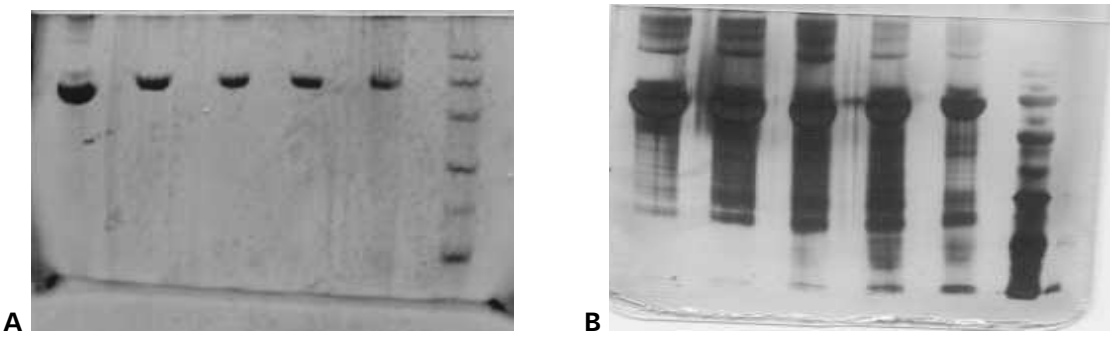
A. Tinción con azul Coomassie: y = 0,9588x + 702,81, r^2 = 0,997

B. Tinción con plata: y = 0,8495x + 3286,5, r^2 = 0,9917

Finalmente, se comprobó que las variaciones apreciables en la temperatura del revelado no afectaron el resultado final cuando se realizó la tinción con azul Coomassie (Tabla 1).

El estudio de estandarización de este método electroforético permitió evaluar diferentes lotes de BSA utilizados en medios de cultivos para el crecimiento microbiano. En la Figura 3 se muestra la presencia de la banda correspondiente a esta proteína con un tamaño molecular de 66 $\pm$ 1 kDa, similar a lo que describe el productor (Sigma). Sin embargo, cuando se utilizó el revelado con plata y se incrementó la cantidad de proteína aplicada hasta 4 µg, se detectaron algunas bandas de menores y mayores tamaños moleculares que no se corresponden con los valores de pureza que declara el productor (99%) y que con la tinción con azul Coomassie no se detectan. Probablemente, se deba a degradaciones de algunas de las moléculas y/o por presencia de otras posibles impurezas (como globulinas del suero bovino) en el producto y que sólo podría demostrarse si se realizara un Western Blot en este sistema, con un suero específico o con un anticuerpo monoclonal contra BSA.

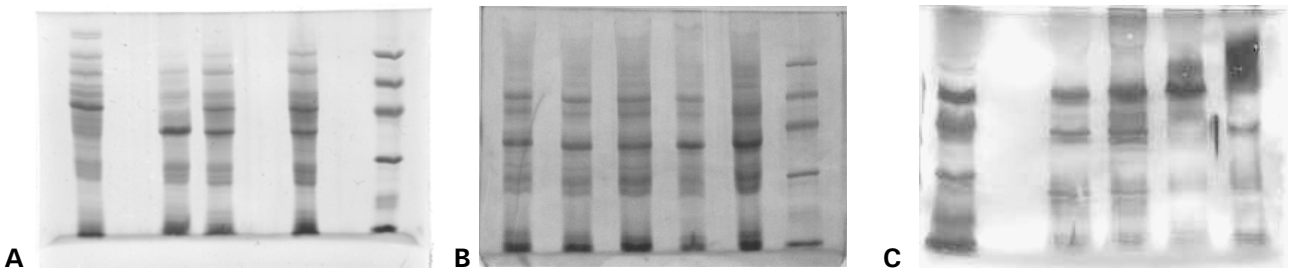
Figura 3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (12,5%) en "Phast System" de diferentes lotes de BSA utilizados en medios de cultivo



Muestra aplicada: BSA (4 μg en 4μL)
Patrones de PM: Fosforilasa b (94 kDa), Albúmina (67 kDa), Ovoalbúmina (43 kDa), Anhidrasa carbónica (30 kDa), Inhibidor de tripsina (20,1 kDa), a -Lactalbúmina (14,4 kDa)
A. Tinción con Azul Coomassie B. Tinción con plata
1 – 4. Lotes BSA para medios de cultivo
5. Lote de referencia BSA (Sigma)
6. Patrón de PM

Gracias a este método, se caracterizaron algunas muestras de proteínas de membrana externa purificadas en la etapa de investigación a partir de tres microrganismos. En la Figura 4 se representan los perfiles electroforéticos principales del estudio realizado .

Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida (12,5 %) en Phast System de proteínas de membrana externa purificadas a partir de diferentes microorganismos



Muestras de proteínas de membrana externa: 2 μg en 4 μL
Patrones PM: Fosforilasa b (94 kDa), Albúmina (67 kDa), Ovoalbúmina (43 kDa), Anhidrasa carbónica (30 kDa), Inhibidor de tripsina (20,1 kDa), a -Lactalbúmina (14,4 kDa)
A. *Vibrio cholerae* : 1 – 4: Proteínas de membrana externa; 5: Patrón PM
B. *Shigella ssp:* 6 – 10: Proteínas de membrana externa; 11: Patrón PM
C. *Leptospira ssp.*: 12: Patrón PM; 13 – 16: Proteínas de membrana externa

Tabla 2. Resumen de los parámetros de estandarización para la determinación del tamaño molecular de biomoléculas por cromatografía en gel.

PARAMETROS DE ESTANDARIZACION	SUPEROSA 12	SEPHACRYL S-100	SEPHACRYL S-1000	SEPHAROSA CL 4 B
REPETIBILIDAD CV (%)	1 – 2,8%	< 2.7 %	0,989	< 2 %
CALIDAD DEL EMPAQUETAMIENTO				
No Platos (m^{-1})	5494	4241	3545.3	3081,7
Altura platos (cm^{-1})	0,018	0,023	0,028	0,032
ASIMETRIA	1	1.23	1 – 1.1	1
LINEALIDAD	$y = -0,7665x + 3,9528$ $r^2 = 0,9969$	$y = -0,3782x + 1,9833$ $r^2 = 0,9886$	--------	$y = -0,5378x + 3,2089$ $r^2 = 0,9929$

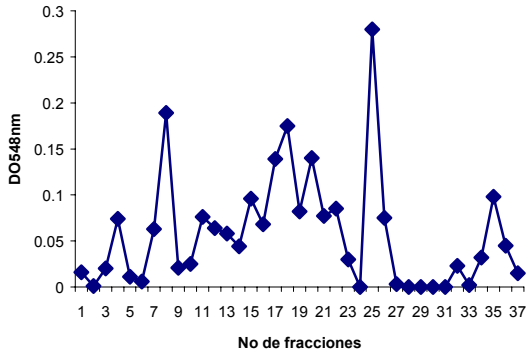
Número de muestras analizadas n = 12 (tres réplicas por determinación)

Cromatografía en gel

El tamaño molecular es una de las características importantes de los antígenos concebidos con fines vacunales y este parámetro puede ser evaluado por cromatografía en gel. Por esta razón, se procedió a la estandarización de la evaluación del tamaño molecular por este método. Este análisis se resume en la Tabla 2, con resultados satisfactorios en términos de la repetibilidad del método. La linealidad fue analizada en tres de las matrices y resultó satisfactoria. En el caso de la cuarta matriz (Sephacryl S-1000) no se comercializan materiales de referencia de altos PM, por lo que se propone evaluar la relación entre el volumen de elusión de las proteínas y el volumen total de la matriz.

En la Figura 5 se muestra un ejemplo del perfil cromatográfico obtenido en Sephacryl S-100 del lipopolisacárido procedente de *P. aeruginosa* como parte de su caracterización molecular. Estos resultados indicaron la presencia de distribuciones de diferentes tallas moleculares de esta biomolécula, lo que permitirá ofrecer elementos para su posterior destoxificación y utilización como antígeno vacunal.

Figura 5. Perfil cromatográfico en Sephacryl S-100 del lipopolisacárido purificado de *P. aeruginosa*



Detección: KDO (DO 548nm)
Solución reguladora: Tris-HCl- EDTA- Desoxicolato de sodio pH 8,5
Flujo: 0,3 mL/min

Conclusiones

La evaluación del sistema electroforético indicó resultados adecuados en cuanto a la linealidad, exactitud, repetibilidad y precisión del sistema.

La determinación de la calidad del empaquetamiento y la precisión del sistema cromatográfico resultó ser satisfactoria para las matrices estudiadas.

Referencias

1. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Edición XXIII. Estados Unidos; 1995.
2. OMS. Technical Report Series 823. Validation of analytical procedures used in the examination of pharmaceutical material; 1992.
3. Catálogo Amersham Biosciences en Latinoamérica; 2003.
4. Gel filtration. Amersham Biosciences. Suecia; 2002
5. Campa C, Sierra G et al. Inventors. Centro Nacional de Biopreparados, assignee. Vaccine against group B *Neisseria meningitides*, gammaglobulin and transfer factor. Ep O301 992 A2; 1988.
6. Westphal O, Jam K. Bacterial Lipopolysaccharides. In Whistter RL (ed). Methods in carbohydrate chemistry. Academic Press. Inc. New York; 1965. 5:83-91.
7. Pharmacia. Manual del Usuario Phast System. Suecia.
8. Castañeda P, Barnés CG. Métodos analíticos. Validación. Comisión Permanente de Farmacopea de Estados Unidos de México. Secretaría de Salud; 1991.
9. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Analytical Procedures and Methods Validation. Guidance for Industry; 2000.
10. Protocolo de Validación PV-11-028. Validación del método de electroforesis en geles de poliacrilamida para la determinación. de la identidad proteica de la vacuna VA-MENGOC BC®; 1999.

Phast System acrylamyde gel electrophoresis and chromatography method standardization for the characterization of new vaccine antigens and culture media components

Abstract

We have analyzed different parameters to standardize the molecular weight determination of new vaccine antigens by gel electrophoresis in the Phast System and by a chromatography method. Linearity was obtained by SDS-PAGE using the reference curves with correlation and determination coefficients higher than 0.98. Repeatability was acceptable and there were no differences between the results of several analysts obtained on three different days. This method is exact and robust under the recommended conditions. Column efficiency was evaluated in four chromatographic matrixes (Superosa 12, Sephacryl S-100 y Sepharosa CL- 4B y Sephacryl S-1000). Good results in both systems allowed the evaluation of outer membrane proteins and lipopolysaccharide from *Vibrio cholerae*, *Leptospira ssp.*, *Pseudomona aeruginosa*, *Shigella ssp*.

Keywords: Standardization, gel electrophoresis, chromatography, *Vibrio cholerae*, *Leptospira ssp*, *Pseudomona aeruginosa*, *Shigella ssp*.